Studiul structurii membranelor celulare folosind metode biofizice

Justin Lazar

1. Introducere. Importanța studiului membranelor celulare

Studiul membranelor celulare este important, deoarece membranele sunt esențiale pentru funcționarea celulei. Proteinele membranelor sunt specializate să realizeze procese extra- și inter-celulare. Un exempu practic este studiul proteinelor membranelor în interventia farmacologica.

Proteinele membranelor sunt nanomasini care permit membranelor să trimită și să recepționeze mesaje și să transporte molecule (nutrienți) înspre și (reziduuri) dinspre celule și compartimetele acestora. Membranele celulare sunt esențiale și indispensabile vieții.

Membranele biologice sunt componente esențiale ale structurii celulelor vii . In celulele eucariote , membranele plasmatice servesc drept barieră specializată, separând interiorul celulei de mediul exterior și permițând organitelor intracelulare să fie compartimentalizate. Ca o consecință a proprietăților lor, membranele biologice joacă roluri vitale în multe procese fiziologice și patologice. Membranele asigură comunicația intercelulară, transportul medicamentelor și metaboliților, și susțin generarea energiei și transmisia semnalelor. Suplimentar față de membranele plasmatice, cele mai multe bacterii și plante conțin un perete celular exterior rigid , cu o compoziție și structură substanțial diferită de a membranelor plasmatice și intracelulare. Indiferent de locația lor , toate membranele biologice sunt foarte dinamice, sunt compuse în principal din lipide și proteine, și au o multitudine de interacții. Perturbarea acestor interacții poate avea efect profund asupra structurii și funcției proteinelor membranei și de aceea, acestea sunt de un interes critic / major în cercetarea farmaceutică, întrucât mai mult de 60% din țintele medicamentelor sunt localizate pe suprafața celulelor sau în membranele celulare. [C]. Membranele proteinelor indeplinesc unele din cele mai importante funcții, ca transportul ionilor și metaboliților și transducția semnalelor chimice și a energiei. [J]

1.1 Abrevieri

3D-ME microscopie electronică tri-dimensională
4D tetra-dimensională (de ex.imagine 3D corelată cu a 4-a dimensiune, timp/sarcina electrică)
BDP Baze de date de proteine
CRX cristalografie cu raze X
IR Infra- Roșu
MA Microscopie atomică / microscop atomic
ME /MCE / MF Microscopie electronică / Microscopie crio-electronică / Microscopie de fluorescență
MFMM Microscopie fluorescentă mono-moleculară
PL moleculă fosfolipidică
RMN rezonanța magnetică nucleară
RMNSS rezonanța magnetică nucleară în stare solidă
RPE rezonanța paramagnetică electronică
RRE rezonanță de rotație (spin) electronică
SF spectroscopie de fluorescență
SFUM spectroscopie de forță unimoleculară
SMN spectroscopie de masă nativă
TM trans-membrană
TROSY Transverse relaxation-optimized spectroscopy-Spectroscopie optimizată cu relaxare transversală

1.2. Dicționar de termeni

Å = ångström : unitate metrică de masura, egala cu 10^{-10} m (0,1 nm)
ligand = un grup, un ion, sau o moleculă coordonată) cu un atom sau moleculă central(ă), într-un complex

2. Studiul Structurii Membranei

2.1. Aspecte Structurale

Diferite aspecte structurale ale membranei pot fi studiate :

- structura (arhitectura) membranei (un complex lipido-proteic)
- componentele membranei (lipide, proteine), care sunt piesele de bază ale membranei. Studiul componentelor membranei este esențial pentru a înțelege funcționalitatea lor (de exemplu, a receptorilor), dat fiind faptul că există o relatie intrinsecă între morfologie și funcționalitate (așa cum este menționat în [H]). Proteinele sunt principalul furnizor al funcțiilor membranei, dar și membranele au un rol f.important, atât în interacțiunea cu proteinele, cât și în semnalizare.[B]

De asemenea, aceste aspecte pot fi studiate

- static, sau
- dinamic (aspect abordat de exemplu, și în Cap. III.A. Natura dinamică a proteinlor membranei [B]), cum ar fi:
  - interferențele / interacțiunea lipidelor cu proteinele (Cap. V, [B])
  - legarea lipidelor de membrana proteinelor
  - predilecția proteinelor membranei de a se auto-asambla (formind discuri ("dimers") sau oligomeri de grad superior).

2.2 Metode biofizice

Progresele obținute în studiul lipidelor și al proteinelor membranelor, furnizează imagini detaliate ale legării lipidelor de proteinele membranei.

Printre instrumentele de **analiza structurii**, **cristalografia cu raze X (CRX)** a fost folosită intensiv pentru definirea complexelor structurale lipido-proteice și pentru identificarea **interfețelor de legătură**.

Tehnici suplimentare ce permit **măsurarea interacțiunilor lipide-proteine,** includ **spectroscopia RMN** atât în soluție, cât și **RMN în stare solidă (RMNSS)**, ca și rezonanța paramagnetică electronică (RPE) [C]. In general, aceste tehnici revelează lipide multiple interacționând cu proteina.

Spectroscopia de masă nativă (SMN) poate revela detalii ale legării proteinelor de lipide, starea proteinelor ce rămân în starea lor pliată și interacțiuni cu legături covalente intra- și inter-moleculare [C]. Dinamica moleculară și teste funcționale sunt de asemenea utilizate pentru definirea lipidelor strâns legate , care sunt critice pentru menținerea structurii și funcționalității proteinelor membranei.

Metodele biofizice utilizate in studiul membranei ar putea fi clasificate ca

- Spectroscopii – CRX, SFUM, SMN, TROSY, de rezonanță (RMN, RMNSS, RPE, RRE), optică;
- Microscopii – MA, ME, MCE, 3D-ME, MF
- Metode Calorimetrice (Calorimetrie cu scanare diferențială) [O], etc.

In acest referat sunt detaliate numai câteva din aceste metode utilizate la studiul structurii membranei: Microscopia atomică (MA) ,RMNSS, CRX, MF.

Un sumar al metodelor utilizate pentru a studia diverse aspecte ale structurii membranei, este prezentat în finalul referatului , în **Tabela 2. Aspecte studiate prin diferite Metode / Tehnici și lucrările de referință (care descriu sau mentionează aceste metode)utilizate.**

3. Compoziția membranelor celulare

3.1 Tipuri de membrane

Membranele sunt de două feluri, ambele tipuri de membrane având aceeasi structură: citoplasmatice (proprii fiecărei celule) și interne (caracteristice eucariotelor (organite)).

3.2 Compoziția chimica a membranelor

3.2.1 Lipidele

Lpidele membranelor constituie 25%...75% din masa membranei (în medie, 40% [A])

3.2.1.1 Tipuri de lipide

- fosfolipidele (P-gliceride) [M]
  - au un cap polar hidrofilic, compus dintr-o moleculă de glicerol și una de fosfat
  - au două cozi hidrofobe compuse din lanțuri de acizi grași (hidrocarburi)
  - conțin atât zone hidrofile, cât și zone hifrofobe / lipofile, și din această cauză, fosfolipidele formează bistraturi în apa (v.Fig.2);

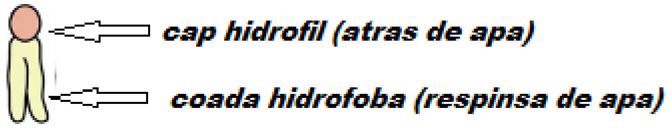


Fig.1 Fosolipida

- sfingolipide
- glicolipide
- steroli / colesterol: determină împachetarea mai strânsă a fosfolipidelor și regularizează fluiditatea și flexibilitatea membranei [M]

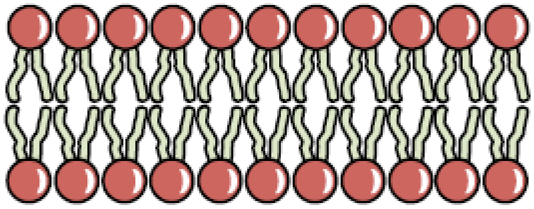


Fig.2 Bistrat Fosfolipidic: capetele hidrofile (fosfat) se orientează spre soluție, iar cozile de acizi grași, hidrofobici, se orientează spre interior

Tipuri de lipide \ % din totalul de lipide	globule roșii	mielina	materia gri cerebrală
fosfolipide (P-gliceride)	40.00%	35.00%	62.00%
sfingolipide	18.00%	35.00%	14.00%
colesterol	41.00%	28.00%	22.00%

Tabela 1. Tipuri de lipide și ponderea lor în diferite tipuri de celule

3.2.1.2 Caracteristicile lipidelor

Amfifilie (amfipatie) - prezenta a 2 domenii cu proprietăți fizico-chimice opuse : un domeniu hidrofil și un domeniu hidrofob, constituit din doi acizi grași . Această proprietate este esențială pentru auto-asamblarea bistratificată.

3.2.2 **Proteinele**

Proteinele membranelor – constituie 20%...75% din masa membranei (în medie, 60% [A]).
Proteinele sunt foarte variate în ceea ce privește **structura, poziția în membrană și funcția**; ele contribuie esențial la diversitate, asigurând funcțiile specifice.
Proteinele **integrale** sunt atașate permanent de membrană și sunt de regulă trans-membranare (se întind de-a lungul celor 2 straturi lipidice). (v.Fig.8).
Proteinele **periferice** sunt atașate temporar de una din suprafețele membranei, prin interacțiuni non-covalente.

3.2.2.1 Structura proteinelor membranei

Amino acizii proteinei sunt localizați în funcție de polaritate: cei non-polari (hidrofobi) se asociază direct cu bistratul lipidic. Cei polari (hidrofili) sunt localizați intern, spre soluția apoasa.
De regulă, proteinele integrale (transmembranare) adoptă una din cele două structuri terțiare: spirale simple / pachete elicoidale, sau "butoaie" Beta (comune în proteinele canal)

3.2.2.2 Funcțiile proteinelor membranei

Proteinele membranei îndeplinesc o varietate de funcții cheie:

- **joncțiuni**: conectează și alătură două celule
- **enzime**: fixate de membrană, localizează caile metabolice
- **transport**: sunt responsabile de difuziunea facilitată (transport pasiv) și de transportul activ
- **recunoaștere**: funcționează ca marcatori pentru identificarea celulară
- **ancorare**: puncte de atașare pentru citoschelet și matricea extracelulară
- **transductie**: funcționează ca receptori pentru hormonii peptidici

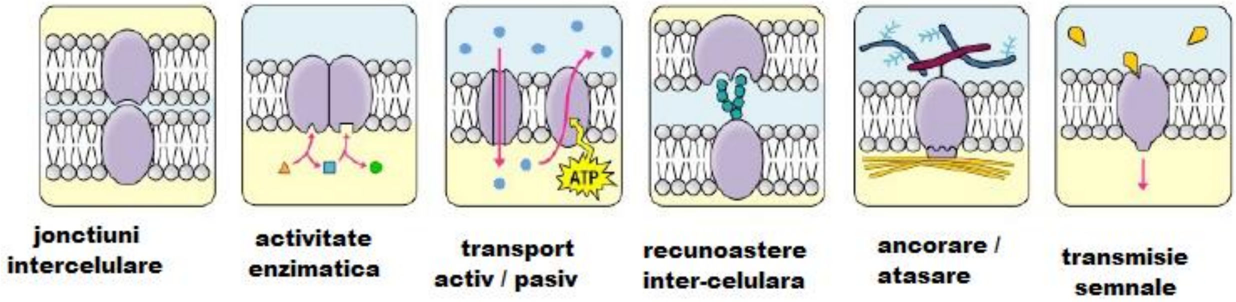


Fig.3 Funcțiile proteinelor

3.2.3 Glucidele membranelor:

Nu există în stare liberă, sunt intotdeauna asociate lipidelor (glicolipide) sau proteinelor (glicoproteine)

-

4. Structura membranei

4.1. Modelul structurii membranei

Toate membranele sunt structurate dupa un model cu **două straturi lipidice, fluid, între care sunt inserate (incastrate) mai mult sau mai putin profund, proteinele membranei, care sunt de 2 tipuri :**

- **intrinseci (integrale)** , puternic asociate celor 2 straturi, putând trece de pe o parte pe alta (deci ele poseda unul sau mai multe domenii **hidrofobe**), sau în care (straturi) sunt înrădăcinate (ancorate) prin lanțuri de lipide sau de acizi grași
- **extrinseci (periferice) –** sunt **hidrofile și** sunt legate de straturi prin legături slabe, de suprafață. Ca și lipidele, proteinele acestea se pot deplasa prin **difuzie laterala**, în interiorul membranei, dar nu pot bascula de pe un strat pe altul

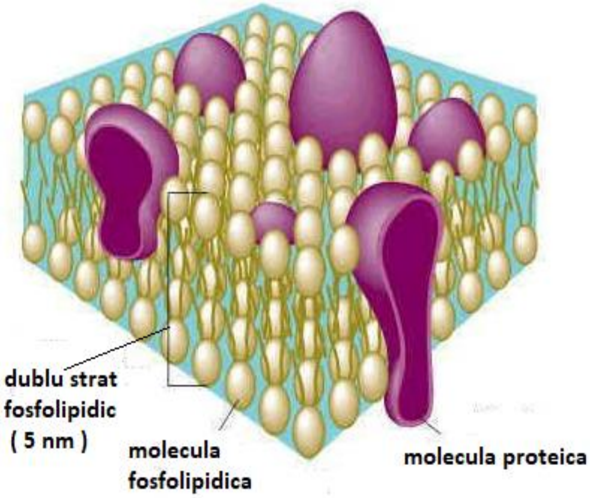


Fig.4 Structura membranei celulare : un complex lipido-proteic

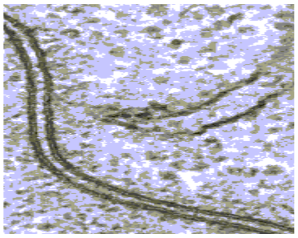


Fig.5. Membrana plasmică separă hialoplasma (mediul intracelular) de mediul extracelular

4.2. Evoluția teoriilor și modelelor membranei celulare

Cunoașterea celulei a început de la Hooke, primul care a utilizat termenul de “celulă” (1665) , Malpighi, care a definit “utricule individuale” (1675), Grew (care a definit “pereții continui ai celulei”, , în 1682), Treviranus, care a demonstrat individualitatea celulelor plantelor (1805). Studiile ulterioare, osmotice și ale membranelor artificiale, ca și lucrările de electro-fiziologie, au continuat cu **prima definire a membranei lipidice celulare – Overton (1899) [K]; Langmuir a demonstrat (1917)** că **lipidele formează un strat monomolecular,** când sunt plasate pe interfața aer-apă. iar **Gorter și Grendel (1925) au dat prima definiție a membranei cu bi-strat lipidic – v. Fig 6. [A], [K]**

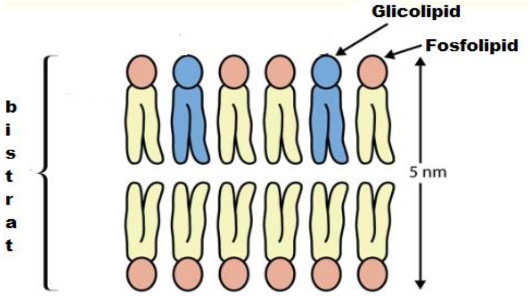
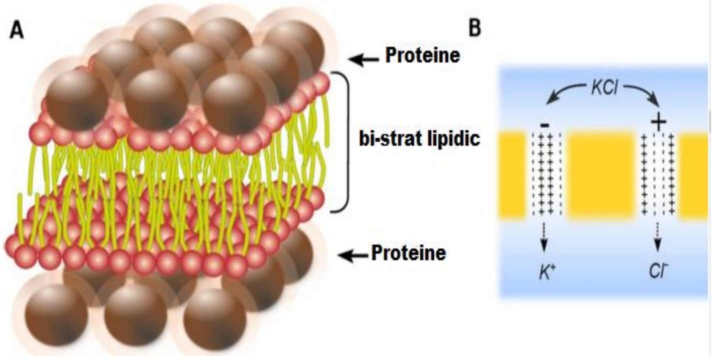


Fig. 6 Membrana cu bi-strat lipidic - Gorter și Grendel (1925) [A], [K]

In anii 1930', **Danielli și Davson au elaborat "Modelul elementar" (cu puține molecule)**, care sugerează existenta porilor acoperiti de proteine, ca și întreg bi-stratul fosfolipidic (de asemenea, acoperit de proteine).[A], [K]. Danielli, cel mai prolific cercetator al epocii, a propus mai multe modele asociate. **Modelul nu explica insă permeabilitatea membranei. Höber a amendat acest model cu ideea unui alternanțe ("mozaic") de solvenți (lipide) și canale (pori),** combinând 2 percepții asupra permeabilității membranelor.[K]



țFig. 7. (A) Structura ipotetică a membranei în anii '30. Modelul cu puține molecule (Danielli și Davson): membrana cu bi-strat lipidic, căptușit cu proteine pe ambele părți.
(B) Modelul "mozaic" al lui Höber

J.D. Robertson propune (în anii '50) un model bi-strat lipidic asimetric, între un strat exterior de glicoproteine și un strat interior de proteine [A]. Ajungem în final la **modelul actual al membranei "mozaic fluid" al lui Singer și Nicholson (1972) v. Fig.8. [A], [K].**

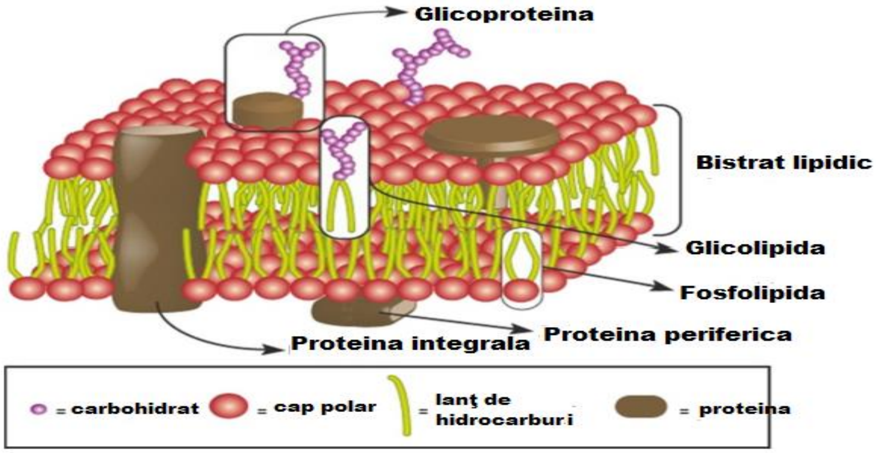


Fig.8. Modelul "Mozaic fluid" - Singer și Nicholson (1972)

5. Metode biofizice

5.1. Soluții. Aspecte dinamice ale structurii

Structurile moleculare pot fi studiate în mod optim, doar în soluții adecvate (folosind solvenți), care le permit să ia forma lor activă (din mediul natural). Forțele care le stabilizează sunt forțe slabe (de ordinul kT, unde k e constanta lui Boltzman și T e temperatura absoluta). care sunt în parte datorate interacțiunii cu solventul. De aceea, studiul sructurii (membranei) moleculelor nu poate fi separată de studiul soluțiilor lor apoase. De asemenea, aspectul termodinamic este esențial: stabilitatea moleculară este maxima la temperatura fiziologica, scazând la temperaturi mai joase sau mai înalte.

Structurile moleculare, inclusiv membranele celulare, apar de obicei în imagini ca structuri statice.

O definiție mai precisă ar fi structuri estimate în "ansamblu", pe o "medie temporală" . In biofizică, se separă de obicei, structura de dinamică, metodele folosite fiind diferite și specializate. Dar experimentele moderne studiază atât structura medie, cât și dinamica ei. [F]- p.8

5.2. Complementaritatea metodelor fizice

Nici o singură metodă nu furnizează toate informațiile despre structură. Fiecare metodă oferă a viziune diferită asupra sistemului, în spatiu și timp: metodele sunt complementare.

5.3. Imagistica. Microscopie Atomică (MA)

Cele mai multe proteine ale membranei sunt însă instabile în soluții, și deci adesea inaccesibile pentru RMN sau cristalografia cu raze X. Microscopul atomic (MA) este un instrument puternic pentru imagistică și manipularea proteinelor membranei , în starea lor nativă. Imagini excelente ale membranelor au fost rezlizate și interpretarea cantitativă a datelor, folosind MA, a devenit posibilă.

Sonde multifuncționale pentru achiziția simultană de informație asupra topografiei și proprietăților electrice, pot fi folosite complementar. [G]

In aproape toate metodele disponibile actualmente, pentru analiza proteinelor membranelor la înaltă rezoluție, proteinele trebuie solubilizate, purificate, și procesate, pentru a le face apte analizei. Sub acest aspect MA este o unica exceptie, permițând ca suprafețele membranelor native să fie scanate și suprafața proteinelor să fia analizată la nivel sub-nanometric, fără dezasamblarea bio-membranei. De aceea, de îndată ce această metodă a fost dezvoltată, MA a furnizat imediat noi înțelegeri asupra organizării native a proteinelor membranei și a complexelor pe care acestea le formează [G]

Prima descoperire în imagistica membranelor native a fost realizată când membrane-disc din retina de șoarece au fost preparate , dispuse pe suport de mică și analizate la MA. Cu o rezoluție suficient de mare pentru a identifica structura de asamblare nativă a Rhodopsinei, o proteina-receptor implicată în foto-transducție. S-a descoperit astfel că rodopsina se aranjează în rânduri de discuri, în contrast flagrant cu alte măsurări anterioare.

In Fig.9 se poate observa topografia membranei: (a) imaginea topografică a suprafeței **citoplasmatice** relevă trimeri de rhodopsina; (b) suprafața membranei **extracelulare** este mai stabilă decât cea citoplasmatică.

In Fig.10 se observă rânduri de discuri de rodhopsina, ceea ce e în contrasct flagrant cu experimente anterioare folosind recuperarea fluorescenta dupa foto-albire. Se confirma astfel descoperirile recente, că foto-receptorii sunt discuri sau oligomeri superiori.

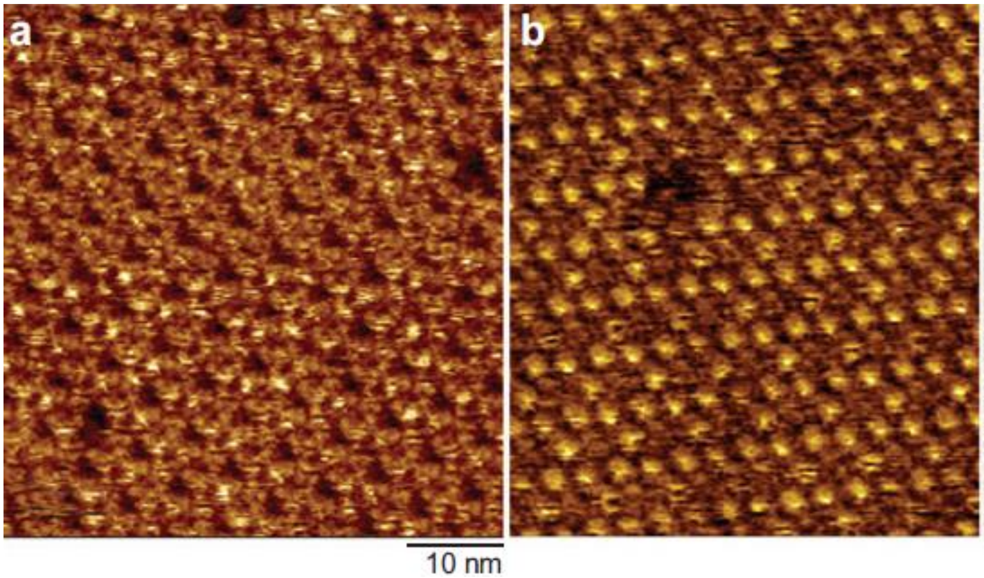


Fig. 9. MA (a) Suprafața membranei citoplasmatice a rodhopsinei. (b) Suprafața membranei exterioare a rodhopsinei [G]

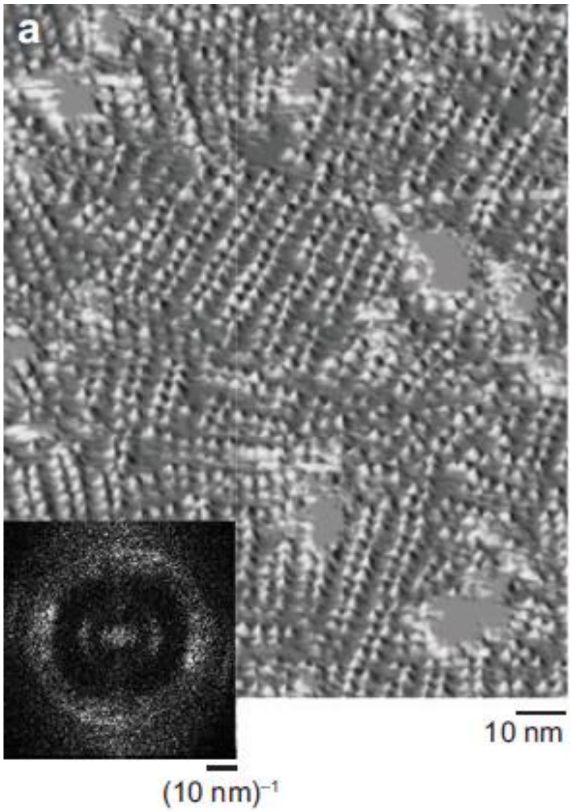


Fig.10. MA: Rânduri de discuri de rodhopsina [G]

5.4 **RMN în stare solidă (RMNSS)**

Principiul ce stă la baza RMN este următorul: multe nuclee atomice se rotesc (au rotație / “spin”) si toate nucleele sunt încărcate electric. Daca se aplică un câmp magnetic extern, un transfer de energie este posibil către nucleu, provocând o tranziție de la energia de bază a nucleului, spre o energie superioară (de obicei, un salt de un singur nivel energetic). Acest transfer energetic are loc la o lungime de undă ce corespunde frecvenței undei electro-magnetice. Când spin-ul revine la nivelul energetic de bază, energia eliberată este emisă la aceeași frecvență. Semnalul emisiei asociate transferului este măsurat în diverse moduri și prelucrat, pentru a furniza spectrul RMN al nucleelor analizate.

Rezonanța magnetică nucleară în stare solidă (**RMNSS**) poate elucida structura și dinamica proteinelor membranei, la nivel atomic. Analizând proteinele din bi-straturile lipide ale membranei, spectroscopia RMN a revelat mecanismele de conducție ionică, dinamica transportului de substrat, și interfețele oligomerice ale proteinelor trans-membranare în spirală. platicitatea conformației ce se află la baza fuziunii virus – membrană celulară (prin ansambluri proteice complexe) și plierea bandei β (din structura proteinei) și asamblarea ei cu proteine amyloidogenice, când e legată de lipidele membranei.

Toate aceste studii arată împreună că proteinele membranei prezintă plasticitate structurală, dinamică conformațională locală și globală, interacțiuni proteine-lipide și proteine-ligand și stari cu un proton suplimentar ale reziduurilor polare [J].

Aceste studii structurale importante sunt posibile datorită unor noi tehnici de îmbunătățire a sensibilității componentelor utilizate, mărirea rezoluției prin campuri magnetice foarte înalte, și apariția tehnicilor de corelare 3D și 4D.

Datorită naturii lor, asociate cu lipidele, proteinele membranei sunt dificil de cristalizat și solubilizat, acestea fiind provocări serioase pentru biologia structurală. Până în prezent, cele mai înalte rezoluții ale structurilor proteice ale membranelor, au fost furnizate de cristalografia cu raze X, iar microscopia crio-electronică a început să reveleze structura membranelor în gama de 3-4 Å.

Comparativ față de aceste tehnici, RMN în stare solidă (RMNSS) furnizează informații biologice unice, autentice, detaliate la nivel atomic, sensibile dinamic, despre structura și dinamica proteinei membranei. Doua aspecte fundamentale ale spectroscopiei RMNSS o fac în special potrivită pentru studiul membranei celulare.

In primul rând, metoda sondează atât structura chimica, cât și structura geometrică tri-dimensională, la nivel de angstrom, prin natura locală a interacțiunilor cu spin nuclear.

Datorită acestui (ultim) aspect, RMN este extrem de sensibila la cele mai mici schimbari structurale ale proteinei, ca acelea ale unor unghiuri de torsiune, legături de hidrogen, sau împachetări moleculare. Cuplări dipolare între nuclee ca 1H, 13C, 15N, 31P, 2H, 19F, pot fi măsurate cu o precizie de 0,1 Å.

Aceste interacții ale spinului nuclear permit RNMSS să studieze terenul proteinelor membranei într-un mod extraordinar de detaliat: de exemplu, protonarea și de-protonarea reziduurilor, deplasarea catenelor laterale, care au importanță funcțională, și miscările coordonate ale unor întregi domenii, pentru transportul de ligand. Toate acestea pot fi observate folosind un set versatil de experimente RMNSS.[J]

In al doilea rând, studiul proteinelor membranei prin RMNSS, este degrevat de cerințele de cristalizare, și poate sonda atât proteine rigide (statice), cât și proteine parțial dinamice din bi-straturile lipidice. Astfel, proteinele membranei pot fi studiate în mediul lor lipidic natural (nativ). O întreagă varietate de membrane celulare întregi pot fi utilizate în experimentele de RMNSS.

Deoarece multe proteine ale membranei prezintă plasticitate structurală ce depinde de sarcina grupului lipidic de care aparrțin, de colesterol, de curba membranei și de alte proprietăți ale membranei, este crucială investigarea proteinelor membranei în starea lor nativă, în membrană, lucru posibil datorită RMNSS. [J]

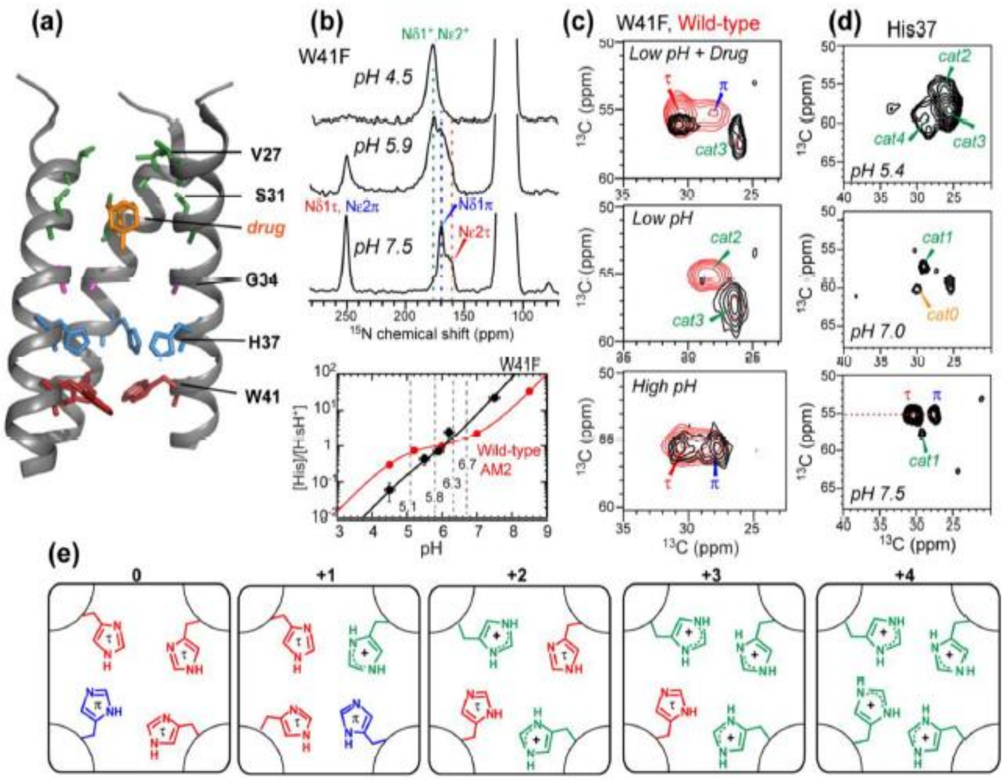


Fig. 11. Studiul structural al canalului proteic al virusului influenza, utilizând RMNSS **[J]**
(a) structura TM (trans-membrană) cu medicament atașat (in galben) din bi-stratul lipidic

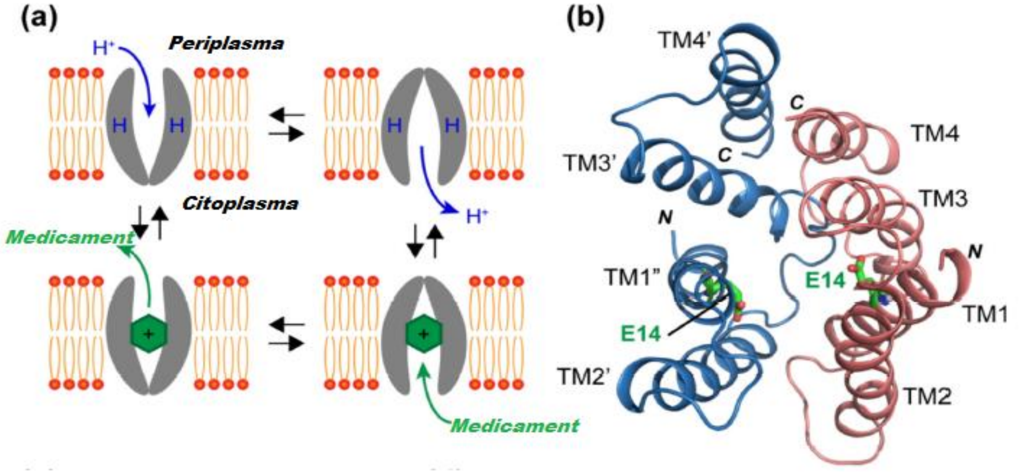


Fig.12. Modelul de acces unilateral al transportului de substrat. Analiza RMNSS [J]

In Fig.12 (a) se ilustrează modelul de acces unilateral (spre pe o singura parte, la un moment dat) al transportului de substrat. **Transportorul este accesibil doar de o singura parte a membranei, la un moment dat,** și o schimbare de conformație a proteinei este necesară, pentru a comuta accesibilitatea între părți. In imaginea (b) se ilustrează modelul asimetric antiparalel al structurii proteinei, în care E14 afectează rata de schimbare conformațională. Interacțiunea cu ligandul și protonarea (achiziția unui proton) au fost studiate folosind RMNSS și mutageneza (apariția sau inducerea unei mutații).

5.5. Cristalografia cu raze X (CRX)

Pentru a înțelege complet mecanismele de funcționare a proteinelor membranei, e necesară determinarea structurii lor 3D (tri-dimensionale). Descifrarea primei structuri a unei proteine, prin CRX, a mioglobinei balenei (proteină prezentă în celulele muşchilor striaţi (muşchii scheletului şi miocardul), jucând un rol esenţial în transportul oxigenului spre aceşti muşchi, dozarea ei fiind utilizată în diagnosticul precoce al infarctului miocardic) le-a adus lui John C. Kendrew și Max Perutz, premiul Nobel pentru Chimie (în 1958). Astăzi, există deja baze de date cu structurile a mii de proteine, ce pot fi consultate de specialiști (v. [H]). In 2015, structura a 70 000 de proteine era analizată folosind CRX (aproximativ 88% din totalul de proteine analizate, din bazele de date de proteine (BDP)). [L]

5.5.1. Principiul metodei CRX

CRX constă în emiterea unui fascicul de raze X înspre o structură cristalină și măsurarea difracției razelor X, dupa ce au trecut de această structura de analizat. Această difracție generează o harta a densității elecronice, arătând unde sunt localizați diverșii atomi ai structurii. Pentru structuri cristaline solide (cuarț, sare), aceasta e un lucru simplu, dar moleculele mari, neregulate, ca ale proteinelor, ridică multe probleme tehnice.[L]. Fig. 13 ilustreaza procesul CRX.

5.5.2. Pregatirea probelor

Inaintea radiografierii cu raze X, proteina trebuie purificată și cristalizată. In membrane, proteinele sunt înconjurate de lipide, de alte proteine, ca și de alte celule.

5.5.2.1. Tehnici de marcaj

O metodă preliminară de a obține proteinele care interesează, este marcajul cu o alta proteină-eticheta, de dimensiuni mici, dar această metodă are frecvent, limitări [L]. Grupe funcționale de proteine sau lipide pot fi marcate chimic (ajutorul enzimelor), cu radio-izotopi, sau substanțe fluorescente,. Marcajul se face in vitro. [N].

5.5.2.2. Tehnici de separare

De regulă, se utlizează detergenti pentru dizolva bi-stratul lipidic, apoi se efectuează o electro-foreză denaturantă, pentru identificarea proteinelor membranei, în timp ce analiza lipidelor se poate face prin cromatografie.

Proteinele extrinseci pot fi extrase din membrană prin tratamente ca schimbarea pH-ului, sau prin forțe ionice [N].

5.5.3. Cristalizarea probelor

Mostra de proteina pura este cristalizată prin evaporarea apei, însa conditiile optime trebuie determinate (temperatura, presiune, umiditate), acest lucru nefiind chiar simplu, și diferind de la o proteină la alta. Pentru proteine solubile, ca mioglobina, condițiile de cristalizare sunt mai simple decât pentru proteinele insolubile ale membranei [L].

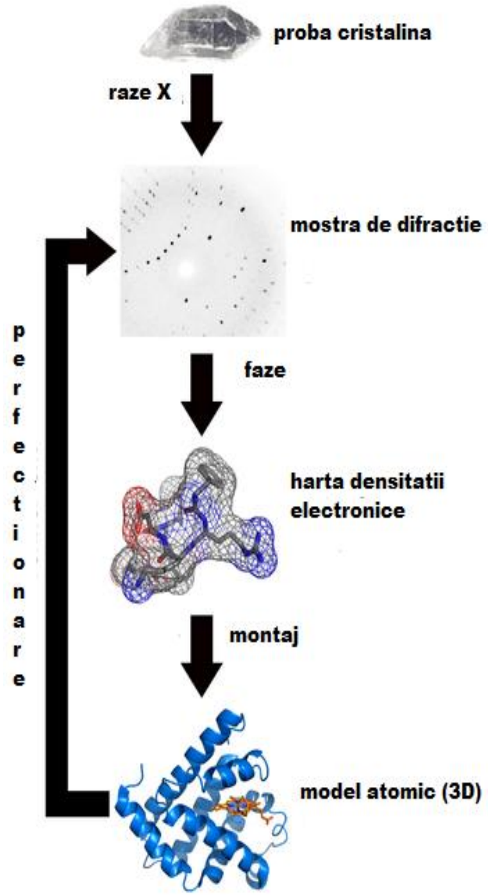


Fig.13. Cristalografia cu raze X a unei proteine

5.6. Microscopia de fluorescență cu excitație multi-fotonică

Metodele clasice (RMN, RPE, spectroscopia în IR (Infra- Roșu), calorimetria cu scanare diferențială) au produs rezultate fie slabe în analiza straturilor lipidice ale membranelor, fie nule, în ceea ce privește organizarea laterală a lipidelor.

Microsopia de fluorescență combină **o tehnică a spectroscopiei de fluorescență** (utilizarea unei substanțe fluorescente cu luminozitate diferită in medii (faze) diferite (de ex., mediu lipidic vs. mediu apos) si excitarea / activarea substanței), **cu avantajele microscopiei** (înaltă rezoluție a imaginii, vizualizare în timp real, în mediul nativ, nealterat a structurii și dinamicii membranei).

Avantajul principal al utilizării diverselor tehnici ale microscopiei de fluorescență, față de abordările tradiționale, este evident: sensibilitatea si flexibilitatea microscopului, care, cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență, permite obținerea de informații despre geometria spațială a membranei, ceea ce completează morfologia membranei cu date despre structura ei (cum ar fi forma și dimensiunea membranei) și dinamica ei (mobilitatea lipidelor, hidratarea). [D].

In analiza membranelor, caracteristicile microscopiei de fluorescență (MF) cu excitație multi-fotonică permit utilizarea probelor fluorescente cu excitație la UV (Ultra Violete), pentru a combina si exploata 2 piese importante: (1) p**arametrii de fluorescență** sensibili la structura laterala a membranei (**schimbarea de emisie dependenta de faza membranei (faza fluidă / gel**), timpii de fluorescență, polarizarea în soluții de lipozomi) ; (2) **informații vizuale** (date morfologice si topologice).

In microscopia cu excitație bifotonică, **probele fluorescente pot fi excitate prin absorbția simultană a 2 fotoni IR** (în loc de UV). Astfel, se reduce semnificativ foto-albirea.

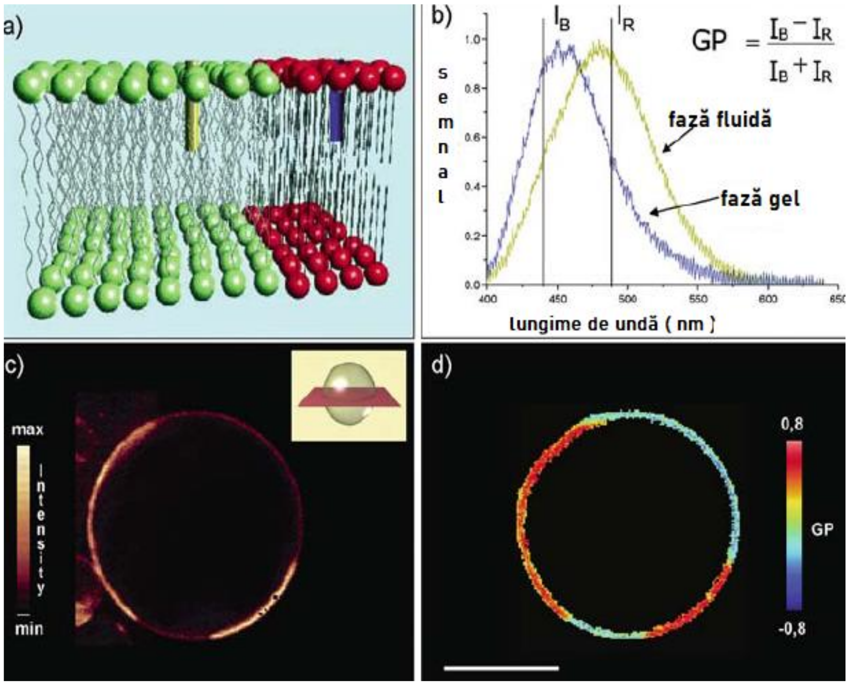


Fig.14. LAURDAN – proprietăți de emisie fluorescentă și polarizare. Distribuția semnalului în membrane prezentând atât faza fluidă, cât si faza gel: (a) schimbare de emisie sensibilă la fază; (b) în faza fluidă / faza gel - Funcția GP, cu variabilele (I_B, I_R) : intensitatățile la marginile spectrului de emisie (B = albastru; R = roșu) folosind o anumită lungime de undă de excitație a probei fluorescente [D]

LAURDAN este o probă fluorescentă cu sensibilitate polară: (1) prezintă o deplasare spectrală de emisie dependentă de fază (albăstruie în lipide ordonate , verzuie în lipide dezordonate), datorită reorientării moleculelor de apă prezente la interfața lipidelor, in zona mediana a fluorescenței probei.

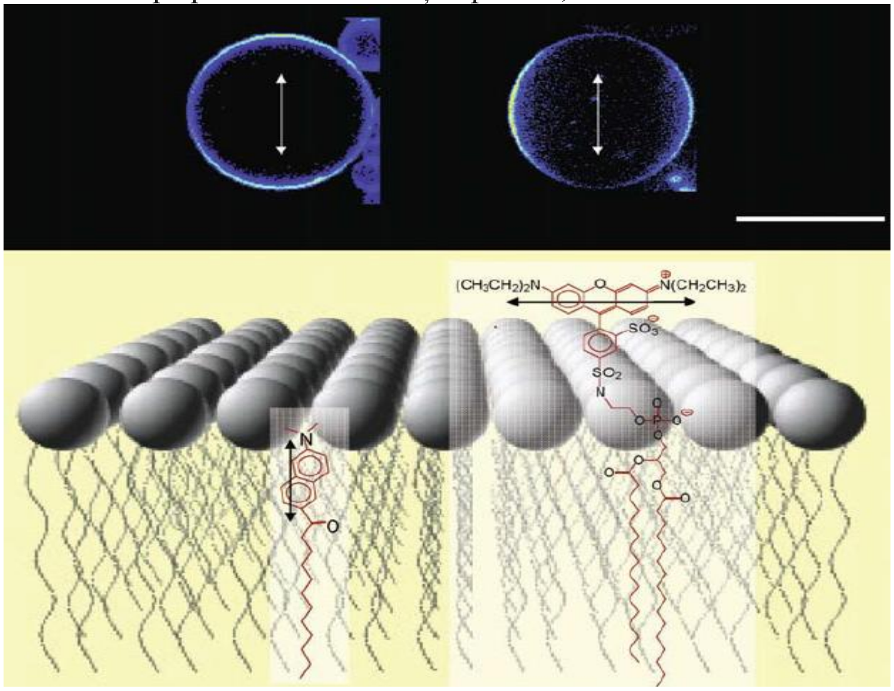


Fig.15. (sus) Proba fluorescentă si (jos) orientarea ei în planul membranei (v.săgeata)

Metoda → / Aspect ↓	CRX	RMN	RMNSS	RPE	SMN	MA	MF	3D-ME	TROSY	MCE	SFUM
Structura complexelor lipido-proteice	[C],[J]	[D]	[J]			[G], [B]	[D]	[J] [D]	[E]	[J]	
Interfețe de legătură	[C]				[C]						
Interacțiunea lipide-proteine	[C]	[C]	[C]	[C]	[C], [I]	[C]	[D]			[C]	[B]
Schimbari în structura proteinelor membranei			[J]			[B]					

Tabela 2. Aspecte studiate prin diferite Metode / Tehnici și lucrările de referință asociate. De exemplu, utilizarea spectroscopiei RMN pentru analiza interacțiunilor lipide-proteine, este menționată în lucrarea de referință [C].

Referințe

[A] Caractéristiques des membranes biologiques - Alessandro VILLA - Université J.Fourier de Grenoble

[B] D.J. MULLER, NAN WU, K.PALCZEWSKI - Vertebrate Membrane Proteins: Structure, Function, and Insights from Biophysical Approaches - Pharmacological reviews 60(1):43-78, April 2008

[C] Bolla JR, Agasid MT, Mehmood S, Robinson CV. 2019. Membrane protein–lipid interactions probed using mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 88:85–111

[D] Jose Luis R.Arrondo, Alicia Alonso , Advanced Techniques in Biophysics – Springer-Verlag, 2006

[E] César Fernández, Gerhard Wider - TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules - Current Opinion in Structural Biology, Volume 13, Issue 5, October 2003, Pages 570-580

[F] Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function - Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai and Joseph Zaccai - Cambridge University Press 2007

[G] Structure and Mechanics of Membrane Proteins - Andreas Engel and Hermann E. Gaub, Annu. Rev. Biochem. 2008. 77:127–48

[H] A Multi-level Nearest Neighbour Algorithm for Predicting Protein – Justin Lazar -1998 - Concordia University, Montreal

[I] Biophysical Techniques in Structural Biology – C. M. Dobson - Annu. Rev. Biochem. 2019. 88:25–33

[J] Structure and Dynamics of Membrane Proteins from Solid-State NMR - Venkata S. Mandala, Jonathan K. Williams, and Mei Hong-Annu Rev Biophys. 2018 May 20; 47: 201–222

[K] Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research - Jonathan Lombard - Lombard Biology Direct (2014) 9:32 DOI 10.1186/s13062-014-0032-7

[L] Biological membranes - Helen Watson, Essays Biochem. 2015 Nov 15; 59: 43–69.

[M] IB Biology Core 2.4: Cell Membranes – Jason de Nys - Australian Int. School - Hong Kong

[N] Biologie cellulaire en 30 fiches - La radiologie pour tous, Jean Claude Callen - Ed. Dunod

[O] Membrane Biophysics - as Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes - H.TiTien, Angelica Ottova Leitmannova - Elsevier, 2000

Dictionar Francez-Roman online French-Romanian Dictionary - WordReference.com

Dictionar Larousse online